

ウズラ反転小腸によるホウレンソウ葉カロテノイドの吸収と レチノイド生成及び血中カロテノイドの 卵黄への移行機作について

高木 茂明・三木 晃・木村 吉伸・佐藤 勝紀^{a)}

(生物資源開発学講座)

Absorption and Cleavage of Spinach Carotenoids in Inverted Quail Intestine and Transfer of the Carotenoids into Egg Yolk

Shigeaki Takagi, Akira Miki, Yoshinobu Kimura and Katsunori Satoh^{a)}

(Department of Bioresources Chemistry)

At incubation with spinach carotenoid of inverted quail intestine, β -carotene was quickly absorbed into the intestinal mucosa and then changed to retinol, passing out of the mucosa. The majority of the xanthophyll including lutein, after absorption into the mucosa, passed out of the mucosa in intact form, and the velocities varied per xanthophylls in descending order of lutein, antheraxanthin, and violaxanthin. It became apparent that out of the absorbed xanthophylls, chiefly lutein was incorporated into quail serum LDL, where it was transported into the egg yolk and accumulated.

Key words : β -carotene, lutein, low density lipoprotein

緒 言

カロテノイドの消化・吸収と代謝についての知見はまだ不十分である。 β -カロテンの15,15'位で酸化分解され2分子のレチナールが生成するという報告^{1,2)}が支持されているようであるが、一方では中央以外の部位で切れてアポカロテナールが生成する結果³⁾も得られており結論が出ていない。さらに多量のカロテノイドとくにキサントフィル類を体内に蓄積する動物としない動物の相異⁴⁾は吸収・分解機構に依存しているものと考えられるが、それについての研究は見当たらない。近年、カロテノイドがガン予防、活性酸素の除去、細胞分化などの重要な生理学的作用を持つことが明らかになって来ており^{5,6,7)}、機能性を持つ食品成分として注目されて来ている。カロテノイドはすべて経口摂取されるものであるが、その吸収・代謝に関する知見は乏しい。ヒトは哺乳動物のうち数少ないカロテノイド蓄積動物であるが、実験

哺乳動物の多くがカロテノイド非蓄積動物であることから、本研究ではカロテノイド蓄積動物のモデルとして日本ウズラを用いた。鳥類が吸収・蓄積するカロテノイドの大部分はキサントフィルであり⁴⁾、この点に関しては哺乳動物と同様と考えられる。また、カロテン類の多くはラット小腸粘膜において酵素的に酸化分解をうけてレチナールを生じ⁸⁾、さらに還元されてレチノールを生じる⁹⁾ためにカロテンとして吸収される量は極めて少なく、この点もカロテノイド蓄積哺乳動物に共通している。ここでは反転小腸を用いてカロテノイドの吸収とレチノイドへの変換の挙動を調べ、さらに吸収カロテノイドが血清低密度リポ蛋白質に組み込まれて卵黄へ移行蓄積することを明らかにしようとした。

Received October 4, 1994

a) 家畜機能調節学

(Department of Animal Science and Technology)

実験材料と方法

1) ウズラ；日本ウズラ(岡山大学農学部の Close colony) は成熟メスをを用い、ウズラ産卵用飼料(丸紅飼料)を自由摂取させた。一夜絶食後、けい動脈を切開して放血致死させ開腹して小腸を取り出した。十二指腸下部から盲腸上部までを小腸として用いた。小腸は約10cm長に切り分けて常法¹⁰⁾により反転した。反転まで小腸は氷冷生理食塩水中に浸し反転後直ちに酵素反応を行わせた。ウズラ2羽を1区とし、2羽分の小腸を全部1区の反応に用いた。

2) 反転小腸のカロテノイドとのインキュベーション；反応混合物は次の組成を持つ。2 mM Nicotinamide, 5 mM GSH, 5 mM Na-Cholate, 150 mM NaCl, 7 mM KCl を含む10 mM Na-リン酸緩衝液, pH 7.7を溶媒として、これにカロテノイドの Tween-20可溶液を加えて反応混合液とし各40 mlを用いた。カロテノイド濃度は β -カロテンの場合10 μ M, 緑葉カロテノイドの場合10 μ M β -カロテンを含むカロテノイドであり、その組成はルテイン, β -カロテン, ビオラキサンチン, ネオキサンチン, アンセラキサンチンがそれぞれ40.8% (15.7 μ M), 25.6% (10.0 μ M), 14.4% (5.6 μ M), 2.6% (4.9 μ M), 7.1% (2.8 μ M)であった。反応後、小腸を氷冷生理食塩水で一回洗滌後粘膜をガラス棒ではぎとり、アセトンを加えてホモゲナイズする。操作は迅速に行い、とくにアセトンを加えるまで2 min以内とした。アセトン抽出液からアセトンを減圧溜去しエーテル：石油エーテル(1：1)混合溶媒で抽出、抽出物から溶媒溜去後ケン化し、不鹼化物画分をメタノール溶液としてカロテノイド及びレチノイド HPLC 分析に供した。

3) HPLC；カロテノイドの HPLC 分析条件はカラムは ODS (Finapak Sil 300C₁₈ T-7), 検出波長 450 nm, 流速1.0 ml/min, 溶媒は(A)95%メタノール水溶液, (B)アセトンの濃度勾配溶出である。レチノールとレチナールの HPLC 分析条件はカラムは ODS (Capcell Pak C₁₈ SG-120), 検出波長350 nm, 流速1.1 ml/min, 溶媒は(A)Acetonitrile：1% Amm. Acetate (8：2)と(B)Acetonitrile：2-Propanol (75：25)の濃度勾配溶出であった。

4) 低密度リポ蛋白質(LDL)の血清からの調製；LDLの単離は鐘淵化学工業(株)で開発された LA-ゲ

ル¹¹⁾を用いたクロマトグラフィーにより行った。ウズラけい動脈から3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を入れた容器に採取した血液を6000 rpm, 10 min 遠沈して血清を得る。生理食塩水で平衡状態にした LA ゲルカラムに血清をそのままのせ、0.9%生理食塩水で洗浄溶出する。この素通り画分を LDL-free 血清とする。次に10 mM Tris 緩衝液, pH7.2に溶かした 2 M NaCl 溶液を流して LDL を溶出し供試した。

5) 卵黄リポ蛋白質の調製；ウズラ卵黄2個に50 mM Tris 緩衝液, pH7.5を約30 ml 加えてよく混合したあと14000 rpm, 2 hr 遠沈する。上澄を蒸留水に充分透析した後6000 rpm, 15 min 遠沈して上部に浮いて来る黄色ゲル状リポ蛋白質をとる。これを 20% NaCl, pH7.0に溶かしてカロテノイド結合リポ蛋白質とした。

6) SDS-PAGE；15%分離ゲルを用い2 mA/lane でスラブ電気泳動法¹²⁾により行った。試料の可溶化には10% SDS を用いた。

結果と考察

1. ウズラ反転小腸による β -カロテン吸収とレチノール生成

β -カロテンを含む反応液にウズラ反転小腸を入れて反応させたときの β -カロテンの吸収量及びレチノール生成量を調べた。反応開始前の小腸粘膜に存在するカロテノイドはラット反転小腸を用いた場合¹³⁾と似て市販飼料に由来するルテイン及びそれより R_tの僅かに大きい未同定のカロテノイドのみであった。 β -カロテンは粘膜画分に吸収され経時的に増加するが粘膜をはぎ取った残画分にはほとんど認められない (Fig. 1)。反応60 min 後、反応液の β -カロテン (0.4 μ mol/40 ml) のうち0.14 μ mol が減少しており、これがウズラ1頭分の小腸(約5.5 g)に吸収されていた。すなわち、25.5 nmol/g 小腸の β -カロテンが吸収され小腸にそのまま又はレチノール等に代謝されて存在することになる。この量は小腸の全 β -カロテン存在量(約10 nmol/g)と全レチノール生成量(約25 nmol)にほぼ見合う量である。小腸内における生成物はレチノールのみであり粘膜画分ではほとんど増加しないが、残画分において顕著な増加が認められる (Fig. 1)。そうして生成レチノール量と粘膜に存在する β -カロテン量とのモル比はほぼ2：1であった。これらのことは β -カロテンが

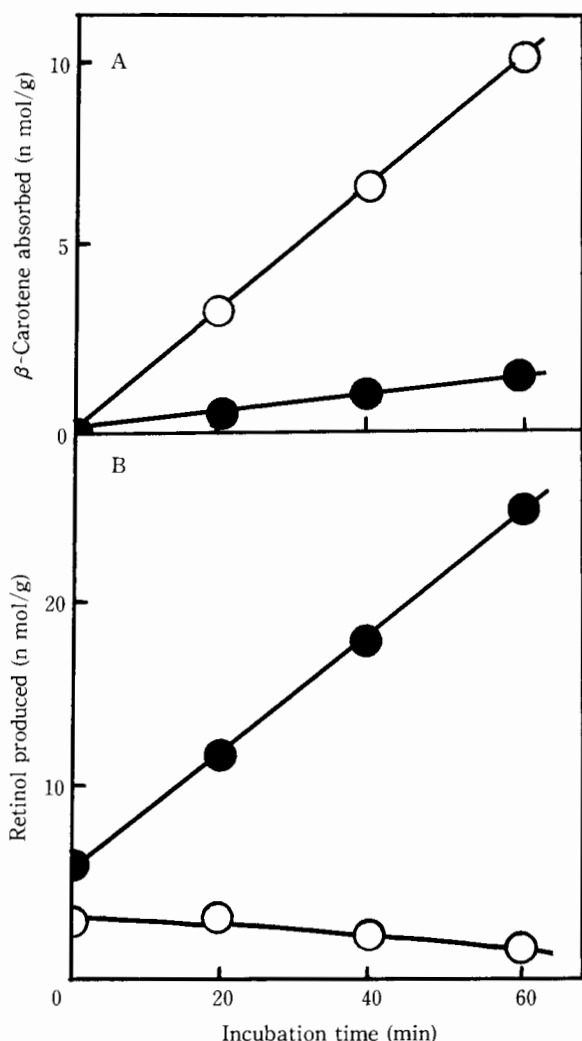


Fig. 1 Absorption of β -carotene (A) and retinol production (B) by inverted small intestine of Japanese quail.

Incubation, at 37°C. Incubation mixture (40 ml) contains; 10 μ M β -carotene, 2 mM nicotinamide, 5 mM GSH, 5 mM Na-cholate, 150 mM NaCl, 7 mM KCl, in 10 mM Na-phosphate buffer, pH 7.7. \circ — \circ , mucosa fraction; \bullet — \bullet residue fraction.

吸収後粘膜細胞において速やかに開裂と還元を受けてレチノールに変化し、生成レチノールは速やかに粘膜細胞から出て行くことを示している。このときレチノールしか検出出来なかったので β -カロテンからレチノールへの一連の反応において β -カロテン 15.15-ジオキシゲナーゼが触媒する開裂反応⁹⁾が律速段階であると見ることが出来る。残画分の β -カロテンの経時的増加が小さいことは、吸収された β -カロテンが粘膜細胞から移行していく速度の小さいことを示している。また60 minまでのいずれの反応時間においても粘膜 β -カロテンのモル数が残画分のモル

数の約1/2となっていることは、 β -カロテンからレチノールへの反応と β -カロテンの吸収とが動的平衡を保っていることを示すものであり、このことは β -カロテンがウズラ小腸において15.15'位で開裂されて2分子のレチノールを生じることを強く示唆する。

2. 緑葉カロテノイドのウズラ反転小腸における吸収とレチノイド生成

β -カロテン単独の場合と同じ濃度 (0.4 μ mol/40 ml) の β -カロテンを含むホウレンソウ葉カロテノイドを同様の方法で供試して、反転小腸における各カロテノイドの吸収とレチノール生成を検討した。各基質カロテノイドの粘膜における存在量が多い順にルテイン、アンセラキサンチン、ヒオラキサンチン、ネオキサンチン、及び β -カロテンであった (Fig. 2)。これは方法の項に示したホウレンソウ葉カロテノイド組成と比較すると、初めから小腸に存在するカロテノイド (大部分がルテイン) を補正しても各カロテノイドがかなり異なる吸収挙動を示していることがわかる。 β -カロテンの吸収量は単独供試の時と比べて約1/20 (10 nmol \rightarrow 0.5 nmol/g intestine) になっていることから、カロテノイド混合物として供試したときにはキサントフィル類が吸収されやすく β -カロテンは吸収され難いことがわかった。粘膜画分には市販飼料に由来するルテインがもとからあるため、ルテインの正味の吸収存在量は Fig. 2 に示す値の1/2以下となる。したがって、粘膜画分において吸収されて存在するカロテノイドのうちアンセラキサンチンが最も多く次いでヒオラキサンチン、ルテインとなっているが、残画分においてはルテインが最も多い。

このことから、ウズラ小腸粘膜にはルテインが特に早く通過できる機構が存在するとも考えられる。一方、 β -カロテンは粘膜画分に少量存在し、残画分には検出できなかった。そこで、このときの両画分におけるレチノール生成量を調べると (Fig. 3)、ホウレンソウ葉カロテノイドの場合には β -カロテン単独供試した時の約1/3であるがレチノールが生成しており、しかも粘膜画分よりも残画分に多い。このことは吸収された β -カロテンから開裂と還元作用によって粘膜で生成されたレチノールが速やかに粘膜から移行していくことを示すものであり、 β -カロテン単独供試の場合に得られた結果と似ている。ホウレンソウ葉カロテノイドを供試したとき β -カロテン単

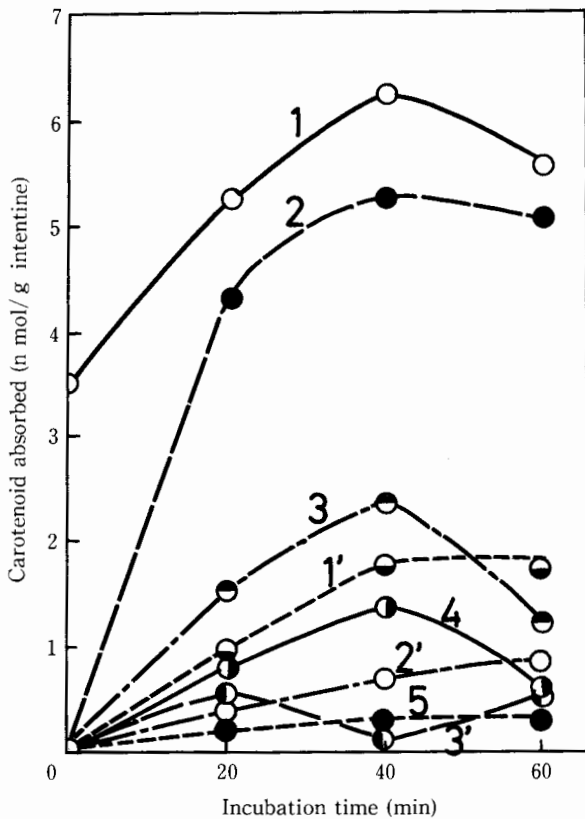


Fig. 2 Absorption of spinach carotenoid by inverted small intestine of quail. Substrate carotenoid, 15.7 μ M lutein; 10.0 μ M β -carotene; 5.6 μ M violaxanthin; 4.9 μ M neoxanthin; 2.8 μ M antheraxanthin. Carotenoid in mucosa fraction; 1, lutein; 2, antheraxanthin; 3, violaxanthin; 4, neoxanthin; 5, β -carotene. Carotenoid in residue fraction; 1, lutein; 2, antheraxanthin; 3, violaxanthin.

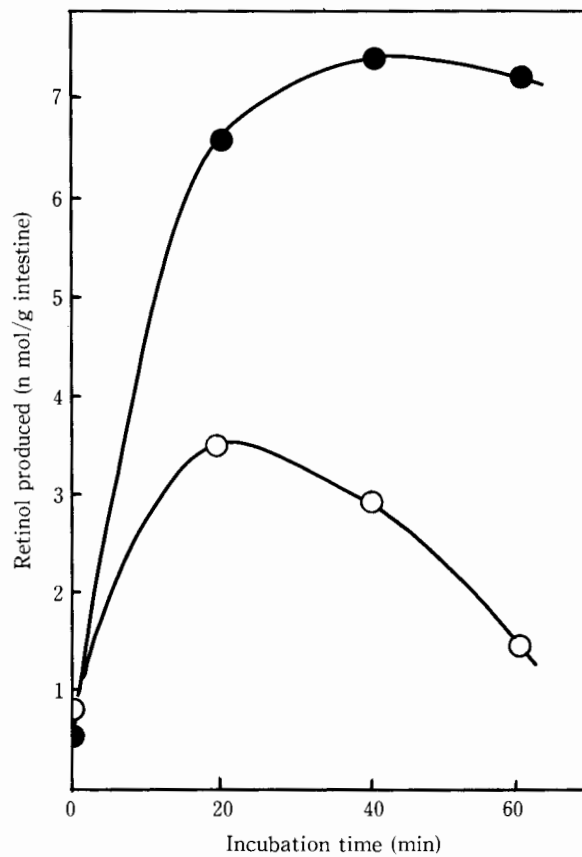


Fig. 3 Retinol production in mucosa and residue fraction of inverted small intestine of Japanese quail at incubation with spinach carotenoid. Substrate carotenoid, with the same concentrations as those shown in Fig. 2. \circ — \circ , mucosa fraction; \bullet — \bullet , residue fraction.

独供試の場合と比べ小腸における β -カロテンの存在量とレチノールの生成量が少ないが、粘膜画分に β -カロテンが多くてレチノールが少なく、残画分では逆に β -カロテンが少なくレチノールが多い傾向は同じであった。この場合もレチノールは検出できなかった。

このような小腸粘膜におけるカロテノイドの吸収の挙動に関して反応溶液からの各カロテノイドの減少量を調べた。その結果 (Fig. 4), ルテイン, アンセラキサンチン, β -カロテン, ビオラキサンチンの順に吸収量は小さくなっており、粘膜画分における存在量と比べ β -カロテンとビオラキサンチンの順序が逆になっている。これは β -カロテンのレチノールへの変化が速やかであるため粘膜画分でみかけの β -カロテン量が少なくなっているからであろう。し

かしながら、反応液からの各カロテノイドの減少量に対し粘膜画分と残画分中のカロテノイド欠びレチノールの合計量はモル比で20%を越えない。その理由として、レチノイド分析において極性の大きな (R_f の小さい) ピークが経時的に増大していることが挙げられるが詳細は不明である。

3. ウズラ血清 LDL のカロテノイド組成とその卵黄への移行

カロテノイド蓄積動物である鳥類卵黄のカロテノイド組成は比較的一定であることがニワトリ卵黄で分かっており¹⁴⁾リポタンパクに結合して存在する。これら卵黄タンパク質は血清リポタンパク質が蓄積したものと考えられているが詳細は不明である。卵黄にあるカロテノイドはルテインを主としたキサントフィルであり、ウズラが吸収したキサントフィルの

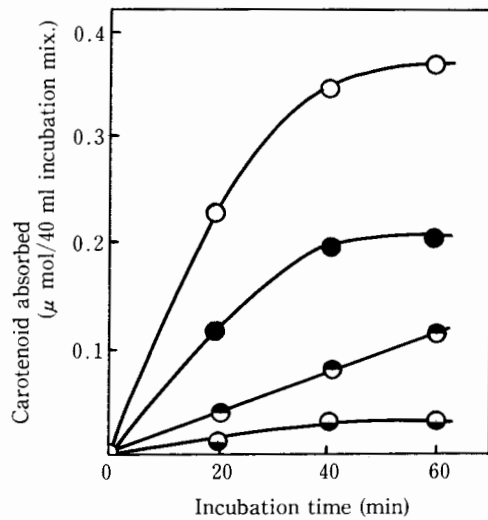


Fig. 4 Spinach carotenoids taken up into inverted small intestine of Japanese quail from incubation mixture.

Substrate carotenoid, with the same concentration as those shown in Fig. 2. Incubation mixture, 40 ml.

○—○, lutein; ●—●, antheraxanthin;
○—○, β-carotene; ○—○, violaxanthin.

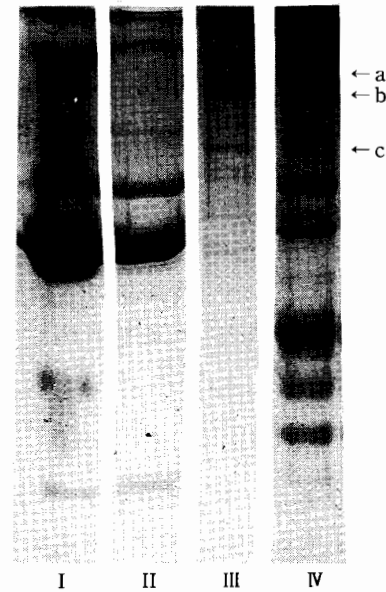


Fig. 5 SDS-PAGE of serum LDL and egg yolk lipoprotein of quail.

Acrylamide conc., 15%. Lane I, total serum; Lane II, LDL free serum; Lane III, LDL; Lane IV, egg yolk lipoprotein.

Bands indicated by arrows a, b and c are deduced as carotenoid carrying LDL.

Table 1 Carotenoid compositions of serum, LDL and egg yolk of quail administered with market diet

Carotenoid	Diet ^{a)} (%)	Mucosa (%)	Serum (%)	LDL (%)	LDL free serum (%)	Egg yolk (%)
U ₁	—	5.9	6.5	12.5	54.0	1.8
Neoxanthin	3.1	2.2	—	4.3	—	—
U ₂	—	8.0	0.8	1.2	17.2	1.4
Lutein	30.8	47.3	56.6	52.3	15.2	65.7
U ₃	—	32.7	31.6	22.3	—	26.7
U	—	2.9	4.5	4.6	3.6	4.3
Carotene ^{b)}	66.1	0.9	—	—	—	—
U ₅	—	—	—	2.9	—	—
Total content (μg/g)	—	—	0.13	0.12	0.01	7.61

a) Nomal diet for laying quail, Marudeni Shiryo Co.

b) Include small amount of carotenes other than β-carotene.

— not detected.

主要な移行先は卵黄と脂肪組織である。ここでは吸収されたキサントフィルが血清 LDL に組み込まれて卵黄に移行蓄積されるかどうかを調べた。

ウズラから採取直後の血液を6,000 rpm, 10 min 遠沈して血清を採り, そのまま0.9%生理食塩水で平衡化した LA-01ゲルカラムにのせ, 生理食塩水でカラムを洗浄後10 mM トリス緩衝液, pH7.2を溶媒に

した2 M NaCl で LDL を溶出した。非吸着画分は LDL-free 血清とした。同一ウズラ個体が前日産んだ卵の卵黄からリポタンパク質を調製した。これら3種の試料を SDS-PAGE に供した。ウズラ LDL は分子量の比較的大きな3種のポリペプチドを含み, このうち350 KD 付近のバンドは LDL-free 血清に認められないので LDL に特徴的なポリペプチドで

あり、さらに卵黄リポタンパク質も同じ位置にバンドを示した (Fig. 5)。また、血清 LDL と卵黄リポタンパク質のカロテノイド組成 (Table 1) を見ると血清 LDL は血清カロテノイドの約92%を含み、卵黄のカロテノイド組成とも近似している。これらの結果から、血清 LDL は吸収カロテノイドのうちルテインを主にしたキサントフィルの運搬体になると同時に、吸収カロテノイドを卵黄に運搬した後卵黄リポタンパク質の一つとして蓄積されていくことが明らかとなった。

ま と め

ホウレンソウ葉カロテノイドをウズラ反転小腸とインキュベートすると β -カロテンは素早く吸収されてレチノールに変化し、粘膜外に移行する。ルテインをはじめとするキサントフィルは小腸に吸収された後 β -カロテン開裂酵素の作用をあまり受けずに粘膜を通過するがその吸収と移行の速度はキサントフィルの種類によって大きく異なり、ルテイン、アンセラキサンチン、ピオラキサンチンの順である。さらに、吸収されたキサントフィルのうち主にルテインは血清 LDL に取り込まれて卵黄に移行蓄積されることを明らかにした。

謝 辞

この研究は平成4年度から6年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究「農作物の生育・品質に関する総合的研究」を分担して行ったものである。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Goodman, D. S. and J. A. Olson : Method in Enzymol., **15**, 462-475, Academic Press, New York (1969)
- 2) Laksman, M. R., I. Mychkovsky and M. Attlesey : Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal by a cytosolic enzyme from rabbit and rat intestinal mucosa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **86**, 9124-9128, (1989)
- 3) Hansen, S. and W. Maret : Retinal is not formed in vitro by enzymatic central cleavage of β -carotene. Biochem. **27**, 200-206 (1988)
- 4) Goodwin, T. W. : The Biochemistry of the Carotenoids. Chapman and Hall, II, 173, London & New York (1984)
- 5) Weisberger, J. H. : Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidant and carotenoid. Am. J. Clin Nutr. **53**, 226-237 (1991)
- 6) Stähelin, H. B., K. F. Gey, M. Eichholzer and E. Lüdin : β -Carotene and cancer prevention: the basal study. Am. J. Clin. Nutr. **53**, 265-269 (1991)
- 7) Murakoshi, M., J. Takayama, O. Kimura, E. Kohmura, H. Nishino, A. Iwashima, J. Okuzumi, T. Saki, T. Sugimoto, J. Imanishi and R. Iwasaki : Inhibitory effects of α -carotene on proliferation of the human neuro-blastoma cell line GOTO. J. Natl. Cancer Inst. **81**, 1649-1652 (1989)
- 8) Goodman, D. S. and H. S. Huang : Biosynthesis of V. A. with rat intestinal enzymes. Science, **149**, 879-880 (1965)
- 9) Bharati, P. K. and D. E. Ong : Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. J. Biol. Chem. **263**, 12916-12919 (1988)
- 10) Plummer, D. T. : 実験で学ぶ生化学, p. 266, 広海啓太郎ら共訳, 化学同人, 京都 (1986)
- 11) 谷 叙孝 : デキストリン硫酸・セルロースによる LDL の選択的吸着と高コレステロール血症治療への応用. BIO media, **3**, 924 (1988)
- 12) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685 (1970)
- 13) 高木茂明 : ラット反転小腸における β -カロテンの吸収と代謝挙動. 日本栄養・食糧学会誌, **47**, 287-293 (1994)
- 14) 高木茂明・中野浩行・木村吉伸・近藤康博・田辺 昭 : 緑葉カロテノイドのニワトリ卵黄への選択的移行とその機構. 岡山大学農学部学術報告, **77**, 1-8 (1991)